金黄色葡萄球菌类肠毒素 K 与 GFP 融合蛋白工程菌的构建及其表达蛋白生物学活性分析

何亚南[1,2]，孙钰椋[1,2]，任雅坤[2]，梁盛英[2]，杨芬[2,3]，刘彦礼[1,2*]，林俊堂[1,2,3]

（[1]新乡医学院生命科学技术学院；[2]河南省医用组织再生重点实验室；[3]新乡医学院生物医学工程学院，河南 新乡 453003）

【摘要】 **目的：**构建携带金黄色葡萄球菌类肠毒素 K（Staphylococcal Enterotoxin-like K, SElK）和绿色荧光蛋白（GFP）融合基因的工程菌，并对 SElK-GFP 融合蛋白进行初步生物学活性分析。**方法：**利用 PCR 和 Overlap PCR 克隆获得 SElK-GFP 融合基因，并插入 pET28a 表达载体中，通过菌落 PCR，质粒双酶切及测序验证后，将构建成功的 pET28a-SElK-GFP 质粒转化到 *E.coli* BL21 菌株中进行诱导表达，通过 Ni^{+}亲和磁珠试剂盒纯化获得 SElK-GFP 融合蛋白；并利用 MTT 法检测 SElK-GFP 刺激小鼠脾淋巴细胞增殖；ELISA 法检测 SElK-GFP 尾静脉注射后小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 IFN-γ的分泌水平。**结果：**成功构建能够表达 SElK-GFP 融合蛋白的工程菌，纯化获得高纯度的 SElK-GFP 融合蛋白可观测到明显的绿色荧光，融合蛋白生物学活性分析表明，SElK-GFP 能够呈剂量依赖性地显著刺激小鼠脾淋巴细胞增殖；同时 ELISA 检测发现 SElK-GFP 可显著增加小鼠血清中细胞因子 IL-2 及 IFN-γ的分泌水平。**结论：**本研究成功克隆、表达及纯化获得高纯度的 SElK-GFP 融合蛋白，其不仅保留了 SElK 的超抗原活性，同时兼具 GFP 绿色荧光的可视性，为深入研究 SElK 生物学活性提供有利工具。

【关键词】 金黄色葡萄球菌类肠毒素 K；超抗原；T 淋巴细胞；原核表达

基金项目：国家自然科学基金（31502045）；新乡医学院博士科研启动基金（505033）

作者单位：453003 新乡，新乡医学院 生命科学技术学院

通信作者：刘彦礼，Email: liuyanli198512@163.com，电话：0373-3029887

The Construction and Functional Analysis of Staphylococcal Enterotoxin-like K and GFP Fusion Protein

HE Ya-nan[1,2], SUN Yu-liang[1,2], REN Ya-kun[2], LIANG Sheng-ying[2], YANG Fen[2,3], LIU Yan-li[1,2] *, LIN Jun-tang[1,2,3]

[1] College of Life Science and Technology，Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003，China;

[2] Henan Key Laboratory of Medical Tissue Regeneration, Xinxiang 453003， China;

[3] College of Biomedical Engineering, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003， China

[Abstract] Objective The aim of this study is to construct the genetically engineered bacteria with full-length fusion gene of Staphylococcal enterotoxin-like K (SElK) and Green fluorescent protein (GFP), and further examine the biological activity of SElK-GFP fusion protein. **Methods** SElK-GFP fusion gene was obtained by overlap PCR and cloned into the plasmid of pET28a; after being confirmed by colony PCR, double digestion and sequence, the successfully constructed pET28a-SElK-GFP was transformed into *E.coli* BL21, and the SElK-GFP was purified by Ni^{+}-affinity magnetic beads. The proliferation of mouse derived spleen lymphocytes stimulated with SElK-GFP was examined by MTT assay; the concentration of IL-2 and IFN-γ in serum of the mice treated with SElK-GFP was examined by ELISA kits. **Results** we successfully constructed the SElK-GFP-producing strain, and the green fluorescence can be observed in high purity SElK-GFP fusion protein. MTT assay showed that SElK-GFP could significantly stimulate the proliferation of spleen lymphocytes in a dose-dependent manner, and the concentration of IL-2 and IFN-γ in serum of the mice treated with SElK-GFP was significantly increased. **Conclusion** SElK-GFP not only retained the green fluorescence signal of GFP but also exhibited SElK superantgen activity, and provide a promising tool for the further study of the biological activity of SElK.

【Key words】 Staphylococcal Enterotoxin-like K; Superantigen; T lymphocyte; Prokaryotic expression

金黄色葡萄球菌肠毒素（Staphylococcal Enterotoxins, SEs）是一组由细菌编码的具有超抗原活性的外毒素蛋白，其无需抗原提呈细胞（APC）的加工处理，即可直接与 APC 膜上的 MHC-II 类分子非限定性结合，以完整的分子形式提呈给 T 细胞，从而活化大量（5%-20%，包括 $CD4^+$和 $CD8^+$T 细胞）具有特异性 Vβ 的 T 细胞，释放大量细胞因子，包括 IL-2、IFN-γ、TFN-α，最终促使机体产生较强的免疫应答 [1, 2]。而且人源 T 淋巴细胞对 SEs 极为敏感，在极低浓度（1-10 ng）下即可有效激活机体的免疫应答。按血清型分析，SEs 可分为 SEA-SEE、TSST-1 和 TSST-2 [1, 3]，并且近来 SER [4]、SEG [5]、SET [6]及 SEM [7]等新型肠毒素也陆续被发现。国内外前期研究多集中在经典肠毒素分子，如 SEA-SEC 及 TSST-1 等，对其抗肿瘤活性及机制开展多项基础及临床前研究，并且发现 SEs 能够产生强烈的细胞介导的细胞毒性，对 MHC II 阳性表达的肿瘤细胞具有较高杀伤作用 [8-13]。然而，有研究表明高剂量 SEs 的使用具有免疫抑制剂活性，可通过诱导 T 细胞的凋亡来降低其抗肿瘤活性[14]，且 SEs 自身存在的肠毒性，及在大剂量使用时能够诱发机体出现催吐、腹泻和发热等毒副作用严重限制了其在临床上的应用[15, 16]。

而随着对 SEs 研究的深入，发现致呕吐毒性不是所有金葡菌肠毒素所必须的，2004 年国际命名委员会（International Nomenclature Committee）将 SEs 中缺乏致呕吐毒性或者致呕吐毒性还未验证的金葡菌超抗原命名为 SEl [17]。尽管有研究证明早期认为无致呕吐毒性的的 SEls 成员（SElK [18, 19]、SElL [20]和 SElQ [21]）具有潜在致呕吐毒性，但其毒性强度相较于典型 SEs 则显著减弱，更易于在临床上应用[22]。而绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）作为报告基因已广泛用于检测靶基因的表达，研究细胞内代谢和追踪细胞分化。因此，在本研究重在通过基因工程手段构建 SElK-GFP 融合基因的工程菌，并对 SElK-GFP 融合蛋白的生物学活性进行初步检测，以期为深入研究 SElK 生物学活性发挥极致提供有利工具，促进 SElK 在临床肿瘤治疗中的应用。[i]

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒

携带 SElK 基因的金葡菌和 GFP 基因的菌株、*E.coli* BL21、*E.coli* DH(5α) 菌株及 pET28a 质粒由本组保藏；6-8 周 SPF 级 BABL/*c* 雌性小鼠，体重（24±2）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司（许可证号 SCXK（京）2012-0001）。

1.2 试 剂

细菌基因组提取试剂盒、质粒提取纯化试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司；BeaverBeads™ IDA-Nickel 试剂盒购自海狸纳米科技（苏州）有限公司；一步法感受态细胞制备试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司；限制性核酸内切酶、Prime STAR Max Premix（2×）、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程（大连）有限公司；牛血清白蛋白（BSA）、IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷）和 MTT（四甲基偶氮唑盐）购自 Sigma 公司；FBS（胎牛血清）和 RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司；ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 SElK-GFP 的克隆及原核表达载体构建

分别将携带 SElK 的金葡菌和 GFP 菌株接种于 LB 液体培养基中，37℃过夜培养，提取基因组 DNA；分别以上述提取到的基因组（携带 SElK 和 GFP 基因）为模板，PCR 特异性扩增获得 SElK 和 GFP 基因片段（引物见表 1），通过 Overlap PCR 扩增获得 SElK-GFP 融合基因，如图 1A 所示，引物见表 1，下划线处分别为 *Eco*R I 和 *Xho* I 内切酶位点。按以下步骤进行 PCR 扩增：95℃ 5 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 2 min，30 个循环；72℃ 10 min，对扩增获得的 SElK-GFP 基因片段纯化后进行双酶切（*Eco*RI 和 *Xho*I），并连接到同样经双酶切的表达载体 pET-28a 中，连接产物转化到 *E.coli* DH5α感受态细胞中，并对获得的阳性菌株进行初步的菌落 PCR、质粒双酶切及测序验证。

表 1　SElK、GFP 和 SElK-GFP 基因克隆所需 PCR 引物

Table 1 The PCR primers of SElK, GFP and SElK-GFP gene

基因		引物（5’- 3’）
SElK	Sense	CGG AAT TCC AAG GTG ATA TAG GAA ***EcoR* I**
	Antisense	AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TAT CGT **The gene encoding linker peptide** TTC TTT ATA AGA
GFP	Sense	GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT ATG GTG **The gene encoding linker peptide** AGC AAG GGC GAG GA
	Antisense	TCG CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC ***Xho* I　Stop codon**
SElK-GFP	Sense	SElK- Sense
	Antisense	GFP- Antisense

1.3.2 SElK-GFP 融合蛋白的诱导表达及纯化

将构建成功的 pET-28a-SElK-GFP 质粒转化至表达菌株 *E.coli* BL21 中，所获得阳性单菌落接种于含卡那霉素（60 μg/mL）的液体 LB 培养基中，37℃过夜培养；以 1%（V/V）接种于新鲜的培养基中（500 mL），37℃振荡培养至吸光度（OD_{600}）为 0.5，加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG，30℃诱导表达，分别于诱导 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h 时收集诱导菌液 1mL，离心收集菌体，PBS 洗 2 遍，100 μL PBS 重悬后转移入 96 孔板中，基于融合蛋白自带的绿色荧光特点，使用酶标仪检测 GFP 荧光信号（490 nm），以此来优化 SElK-GFP 融合蛋白诱导时间。诱导结束后离心收集菌体，超声破碎，使用 BeaverBeads™ IDA-Nickel 磁珠纯化试剂盒对 SElK-GFP 进行纯化，4℃透析 48 h（每隔 12 h 更换 PBS）后于-80℃储存备用。通过 SDS-PAGE 检测 SElK-GFP 诱导表达及纯化效果，BSA 法测定蛋白浓度。

1.3.3 MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞增殖活性

无菌条件下常规制备小鼠脾脏淋巴细胞悬液，用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度到 1×10^7 个/mL。然后将稀释好的细胞悬液加至 96 孔板中，每孔加入 100 μL；用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基将稀释后的 SElK、GFP 和

SElK-GFP 分别加入 96 孔板中，每孔 100 μL，使 SElK、GFP 和 SElK-GFP 的终浓度分别都为 0.01、0.1、1、10 μg/mL，阴性对照组为 10 μg/mL BSA 的处理组，空白对照为 10% FBS 的 RPMI1640 培养基，每个样品设置 5 个复孔。铺板后在 37℃，5% CO_2 培养箱中连续培养 48 h；常规 MTT 法计算增殖指数（Proliferation Index, PI）：PI=实验孔吸光值/阴性对照孔吸光值 [19]。

1.3.4 体内细胞因子检测

将小鼠随机分为 4 组（n=5），SElK 组动物尾静脉注射浓度为 1 μg/mL 的 SElK 溶液 200 μL（溶于 PBS 中），GFP 组动物尾静脉注射浓度为 1 μg/mL 的 GFP 溶液 200 μL，SElK-GFP 组动物尾静脉注射浓度为 1 μg/mL 的 SElK-GFP 溶液 200 μL，对照组注射等量 PBS；于注射蛋白不同时间节点 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h）尾静脉采血 50μL，稀释于等量含有肝素的 PBS 中，3000 rpm 离心 10 min 获得上清，-80℃保存。采用相应的 ELISA 试剂盒按照说明书检测血清中 IL-2 和 IFN-γ的含量。

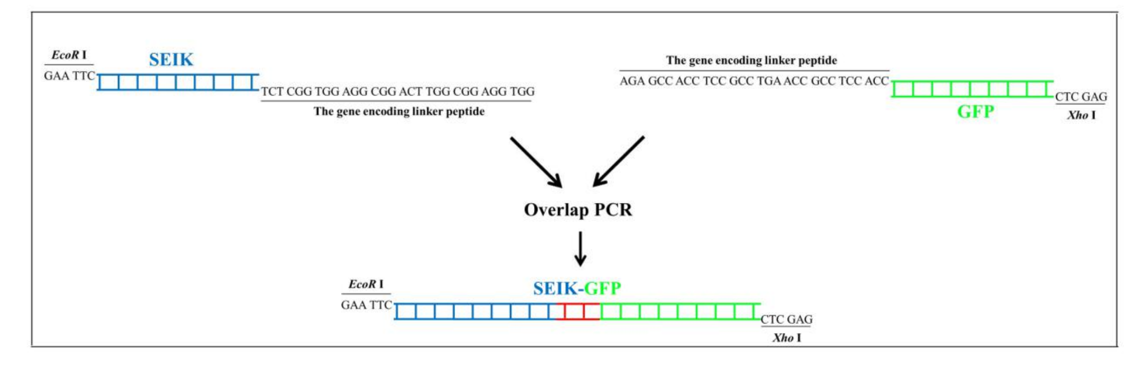
1.3.5 数据分析

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据统计分析。各组间采用配对设计样本的 t 检验，用均值比较的单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 SElK-GFP 生产菌株的构建及鉴定

通过常规 PCR 法扩增分别获得 GFP（720 bp）和无终止密码子的 SElK（657 bp）基因片段（如图 1（b）中 1-4 泳道所示）；随后通过 Overlap PCR 扩增获得融合基因 SE1K-GFP（1407 bp），并通过琼脂糖凝胶电泳检测（图 1（a）的泳道 5 和 6）。进一步对转化 *E.coli* DH5α所获得的阳性克隆菌株进行菌落 PCR，产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 1（c）中 1、2 泳道所示；菌落 PCR 鉴定正确后，随机挑选阳性克隆菌，扩大培养，常规质粒提取后进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切验证；琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1（c）中 3、4 泳道所示。菌落 PCR 和双酶切结果均显示正确后，将提取质粒送往苏州金唯智生物科技有限公司进行最终测序验证，确保 pET28a-SElK-GFP 载体构建的准确性。



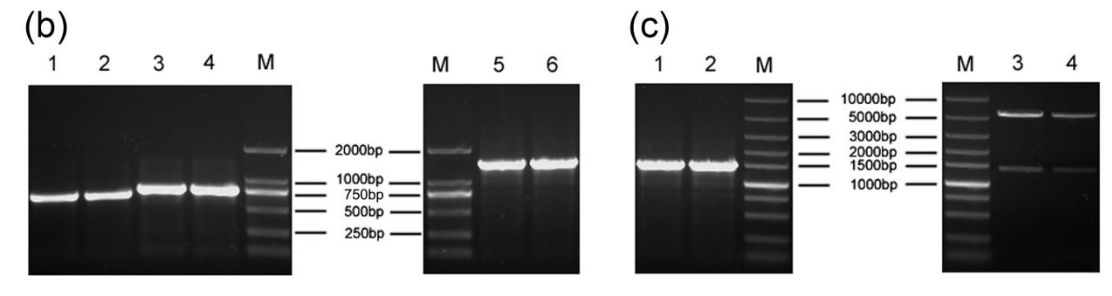


图 1 SElK-GFP 原核表达载体构建及鉴定

Fig. 1 The constrction and identification of pET-28a-SElK-GFP

(a) Map of constructing SElK-GFP fusion gene by Overlap PCR (b) PCR products of SElK (lane 1 and 2), GFP (lane 3 and 4) and SElK-GFP fusion gene (lane 5 and 6) were analyzed by electrophoresis (c) The results of colony PCR (lane 1and 2) and double digestion of pET-28a-SElK-GFP by *EcoR* I and *Xho* I (lane 3 and 4).

2.2 SElK-GFP 融合蛋白表达纯化与荧光检测

根据融合蛋白自带绿色荧光特点优化诱导时间，结果图 2(a)所示：IPTG 诱导后的菌液在紫外照射下可见明显绿色荧光，并且诱导 6 h 后荧光即可达到稳定期，延长诱导时间荧光信号无明显变化，表明 SElK-GFP 融合蛋白的最佳诱导时间为 6 h（图 2(b)）。随后，SDS-PAGE 鉴定结果如图 3(a)所示，表明经 IPTG 诱导后可高效获得 SElK-GFP 蛋白，其分子量约为 54kD。随后经 BeaverBeads™ IDA-Nickel 磁珠纯化后获得较高纯度（＞95%）的 SElK-GFP 融合蛋白。

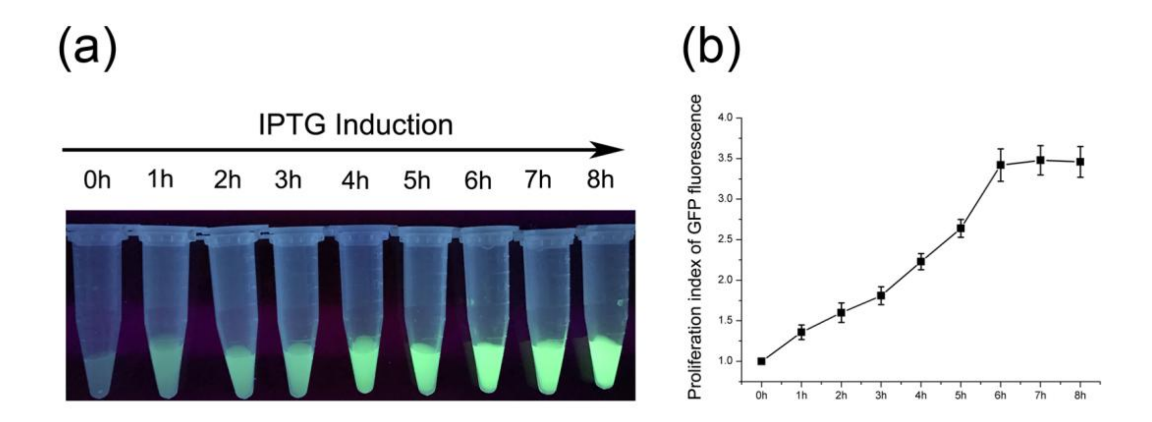


图 2 SElK-GFP 的诱导表达过程中绿色荧光的检测

Fig. 2 Detection of green fluorescence during the expression of SElK-GFP

(a) The expression of SElK-GFP induced with IPTG at 30℃ for 8h (b) Quantification of GFP fluorescence.

2.3 SElK-GFP 呈剂量依赖性促进小鼠脾淋巴细胞增殖

通过 MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞的增殖能力来初步评价 SElK-GFP 的超抗原活性，结果如图 3(b)所示：在 0.01、0.1、1 和 10 μg/mL GFP、SElK 和 SElK-GFP 作用 48 h 后，GFP 对小鼠脾淋巴细胞的增殖无刺激作用，而 SElK-GFP 融合蛋白与 SElK 一致，均可呈现剂量依赖性地显著刺激小鼠脾淋巴细胞增殖（$P<0.05$），且二者刺激增殖效果无统计学差异。

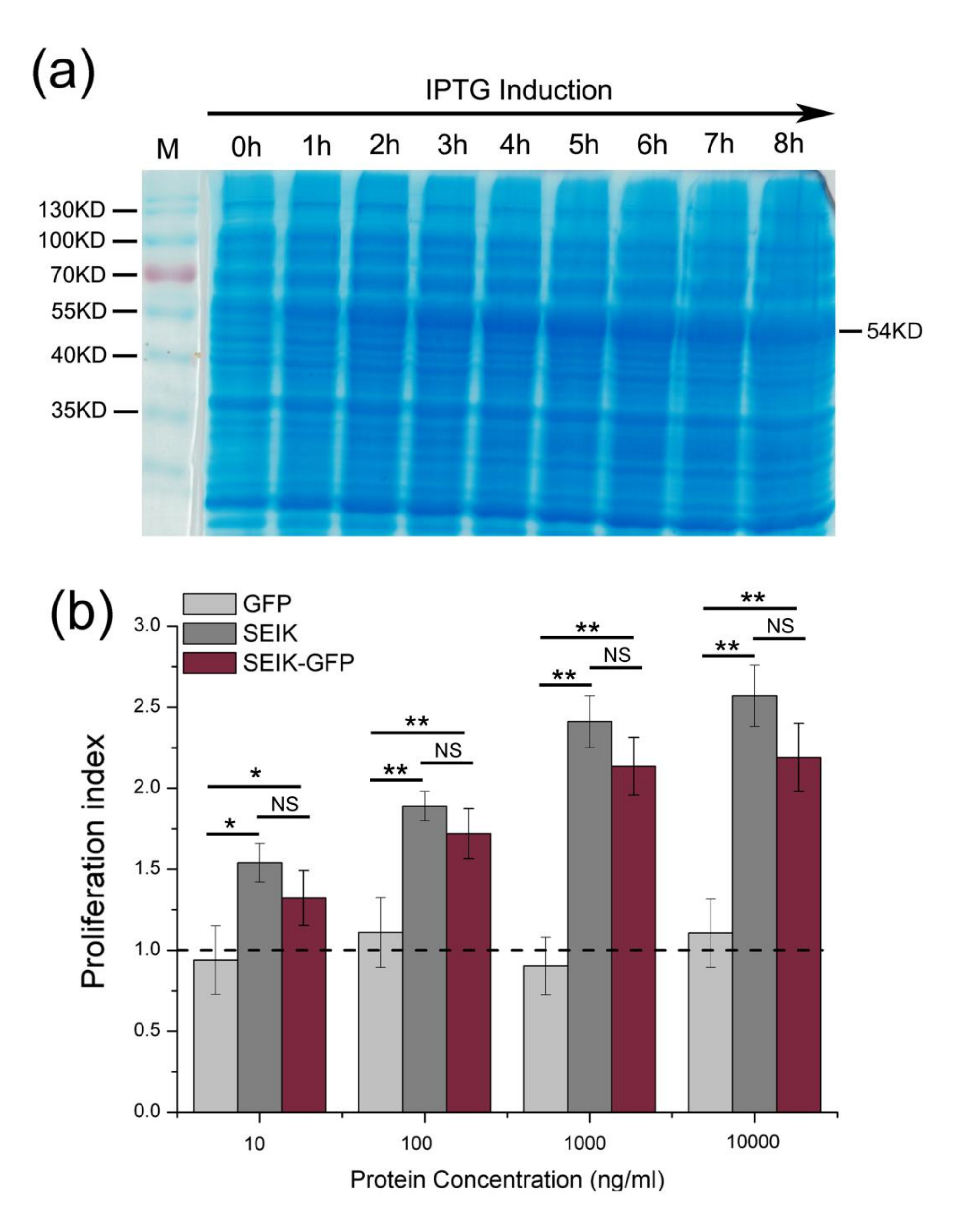


图 3 SElK-GFP 蛋白的纯化和体外刺激小鼠淋巴细胞增殖活性检测

Fig. 3 The purification of SElK-GFPand the proliferation index of splenic lymphocytes stimulated by SElK-GFP in vitro

(a) The expression of SElK-GFP induced with 1 mM IPTG at 30 ℃ for 8 h. The samples were taken from 0 and 8 h throughout the inducible expression period and were analyzed by the SDS-PAGE M: protein molecular mass standards (b) Murine splenic lymphocytes were incubated with different concentrations of SElK, GFP and SElK-GFP for 48 h, and the proliferation capacity was determined by MTT assay. The red dashed line indicated the PI of the BSA treated group (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; NS, no significant difference).

2.4 SElK-GFP 显著刺激小鼠体内细胞因子表达

小鼠尾静脉分别注射 SElK、GFP、SElK-GFP 融合蛋白及 PBS 后，通过 ELISA 检测不同时间点所获得的血清中 IL-2 和 IFN-γ的分泌水平。结果如图 4 所示：SElK-GFP 融合蛋白与 SElK 作用趋势一致，在注射 60h 后 IL-2 分泌水平较对照组显著增加（$P < 0.05$），在整个检测时间点内呈逐渐上升趋势；而 IFN-γ分泌水平在注射 12 h 后显著增加至峰值（$P < 0.01$），随后便快速降低，至 36 h 时已恢复正常水平；而 GFP 对小鼠体内 IL-2 和 IFN-γ的分泌无促进作用。

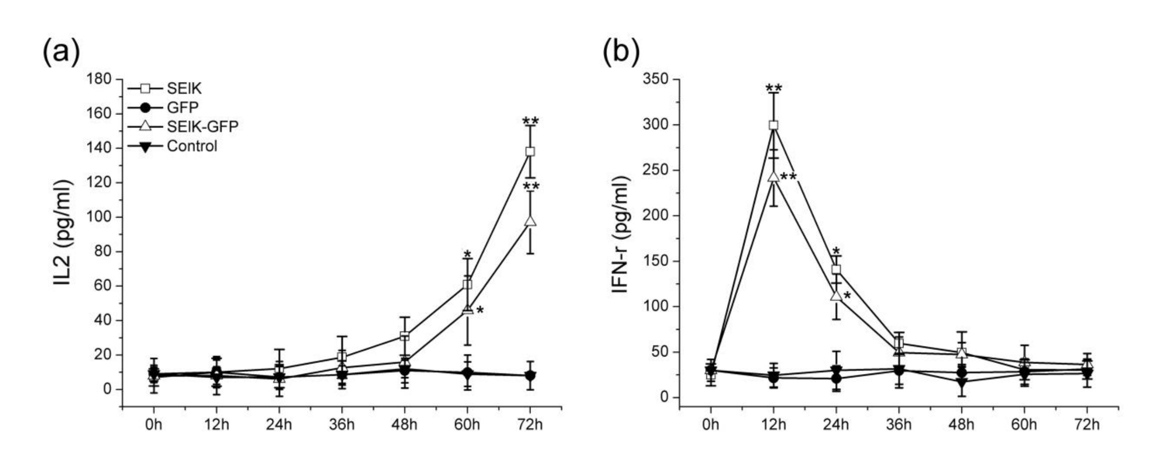


图 4 SElK-GFP 体内刺激细胞因子 IL-2、IFN-γ的分泌水平

Fig. 4 Concentration of IL-2 and IFN-γ in serum of the mice treated with SElK-GFP (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$)

3 讨论

近年来，对 SEs 的研究主要集中在其诱导的免疫活化过程中各淋巴细胞相互作用和信号转导途径 [23, 24]，及其诱导相关疾病发生的作用机制 [15,16]。而对 SEs 的应用研究除集中在对其诱导相关疾病发生的预防及治疗外，利用其超抗原活性将其开发成为新型抗肿瘤药物也得到了国内外广泛的关注[8-13]。尽管 SEs 在肿瘤治疗领域展现出了较强的应用前景，但其自身所固有的肠毒性及致呕吐毒性会产生严重副作用，从而限制了其作为新型抗肿瘤制剂的应用，而缺乏致呕吐毒性或致呕吐毒性较低的 SEls 的发现为开发新型抗肿瘤制剂提供了候选药物 [25]。

本课题组前期已经成功克隆并获得高纯度 SElK 蛋白 [19]，并对其超抗原活性进行了系统研究，然而由于缺乏有效的抗体及示踪方法，严重阻碍了对 SElK 超抗原活性及抗肿瘤机制的研究。前期研究表明，SEs 与其特异性 TCR Vβ的亲和力介于 10^{-4}-10^{-6} M 之间，该亲和力大小与抗原肽/MHC II 复合物与相应 TCR Vβ亲和力（10^{-4}-10^{-7} M）相似，但远低于抗原抗体亲和力（10^{-8}-10^{-1} M）[26-28]。我们

推测 SElK 与其特异性 TCR Vβ的亲和力应该与 SEs 一致，因此普通研究方法中重悬、离心等操作将会很容易破坏 SElK 与其特异性 TCR Vβ的结合。此外，传统的示踪方法的复杂性和破坏性，也不易于在体内研究 SElK 与相关细胞的相互作用。因此，我们认为构建荧光蛋白标记的 SElK 将会是深入研究 SElK 超抗原活性发挥的机制及潜在抗肿瘤应用提供有利工具。

GFP 是近年来在细胞生物学中应用最广泛的标记蛋白之一，其分子量小，在细菌和真菌细胞中表达时无明显毒性作用，可以在活细胞内进行功能研究；不需要添加任何底物和酶，在蓝光或紫外光激发下能发出较强的荧光，且荧光性质稳定不易猝灭，是一种稳定的可溶性蛋白[11]。因此，本研究通过 Overlap PCR 技术成功构建 SElK-GFP 融合基因的原核表达载体。在融合蛋白设计过程中，考虑到 SElK 与其特异性 TCR Vβ和 MHC II 结合位点 [29]，我们将 GFP 标签设计在 SElK 片段的 C 末端；并通过一段由 10 个甘氨酸和丝氨酸（GGGGSGGGGS）组成的短肽连接，前期研究已证明该连接肽可有效减少融合蛋白分子间的空间位阻效应，从而最大限度地维持融合蛋白各分子原始构象，保留融合蛋白各分子功能 [13, 30]。随后，SElK-GFP 融合蛋白的诱导表达验证了上述设计的可行性，在诱导的不同时间节点均可明显观察到绿色荧光，并根据荧光强度确定最佳诱导时间为 6 h。进一步，通过 Ni^{+}亲和磁珠获得高纯度 SElK-GFP 融合蛋白后对其生物学活性检测亦表明，SElK-GFP 融合蛋白与 SElK 生物学活性一致，不仅能够在体外显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖，而且能够在体内促进 IL-2 和 IFN-γ的表达，激活机体免疫反应。

综上，本实验成功构建并表达 SElK-GFP 融合蛋白，其兼具 SElK 的超抗原活性及 GFP 的绿色荧光属性，可为深入研究 SElK 超抗原活性发挥的机制及潜在抗肿瘤应用提供有利工具，并对后续融合蛋白的构建提供借鉴。

参考文献

[1] Spaulding A R, Salgado-Pabón W, Kohler P L, et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(3): 422-447.

[2] Sundberg E J, Li Y, Mariuzza R A. So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signaling complexes. Curr Opin Immunol, 2002, 14(1): 36-44.

[3] Müller-Alouf H, Carnoy C, Simonet M, et al. Superantigen bacterial toxins: state of the art. Toxicon, 2001, 39(11): 1691-1701.

[4] Omoe K, Imanishi K, Hu D L, et al. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. Infect Immun, 2004, 72(6): 3664-3667.

[5] Fernández M M, Bhattacharya S, De Marzi M C, et al. Superantigen natural affinity maturation revealed by the crystal structure of staphylococcal enterotoxin G and its binding to T-cell receptor Vβ 8. 2. Proteins, 2007, 68(1): 389-402.

[6] Ono H K, Omoe K, Imanishi K, et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun, 2008, 76(11): 4999-5005.

[7] Zhao Y, Zhu A, Tang J, et al. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M (SEM) from Staphylococcus aureus isolate associated with staphylococcal food poisoning. Lett Appl Microbiol, 2017.

[8] Ragin M J, Sahu N, August A. Differential regulation of cytokine production by CD1d-restricted NKT cells in response to superantigen staphylococcal enterotoxin B exposure. Infect Immun, 2006, 74(1): 282-288.

[9] Liu Y, Xu M, Su Z, et al. Increased T-cell stimulating activity by mutated SEC2 correlates with its improved antitumour potency. Lett Appl Microbiol, 2012, 55(5): 362-369.

[10] Zhou J, Liu L, Xu M, et al. T-cell proliferation and antitumour activities of a truncated mutant of staphylococcal enterotoxin C2 with decreased cytokine secretion. J Med Microbiol, 2013, 62(3): 451-456.

[11] Mundiñano J, Berguer P M, Cabrera G, et al. Superantigens increase the survival of mice bearing T cell lymphomas by inducing apoptosis of neoplastic cells. PloS One, 2010, 5(12): 15694.

[12] Xu M, Wang X, Cai Y, et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity and low toxicity. Cancer Immunol Immun, 2011, 60(5): 705-713.

[13] Sun J, Zhao L, Teng L, et al. Solid tumor-targeted infiltrating cytotoxic T lymphocytes retained by a superantigen fusion protein. PLoS One, 2011, 6(2): e16642.

[14] Seo K S, Lee S U, Park Y H, et al. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. Infect Immun, 2007, 75(1): 260-269.

[15] Salgado-Pabón W, Breshears L, Spaulding A R, et al. Superantigens are critical for Staphylococcus aureus Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury. MBio, 2013, 4(4): e00494-13.

[16] Mörbe U M. Molecular effects of Staphylococcus aureus toxins and their contribution to pathogenesis. Utrecht: Utrecht University, 2013.

[17] Lina G, Bohach G A, Nair S P, et al. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. J Infect Dis, 2004, 189(12): 2334-2336.

[18] Paul M, Donald Y, Heather L, et al. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. Infect Immun, 2001, 69(1): 360.

[19] 刘彦礼, 牛荣成, 杨芬, 等. 金葡菌类肠毒素 K 原核表达载体构建及其生物学活性分析. 中国生物工程杂志, 2015, 35(12): 45-50.

LIU Yan-li, NIU Rong-cheng, YANG Fen, et al. The Construction and Functional Analysis of Staphylococcal Enterotoxin like K. China Biotechnology, 2015, 35(12): 45-50.

[20] Orwin P M, Fitzgerald J R, Leung D Y M, et al. Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L. Infect Immun, 2003, 71(5): 2916-2919.

[21] Orwin P M, Leung D Y M, Tripp T J, et al. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry, 2002, 41(47): 14033-14040.

[22] Omoe K, Hu D L, Ono H K, et al. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect Immun, 2013: IAI. 00550-13.

[23] Krakauer T. Update on staphylococcal superantigen-induced signaling pathways and therapeutic interventions. Toxins, 2013, 5(9): 1629-1654.

[24] Omoe K, Nunomura W, Kato H, et al. High affinity of interaction between superantigen and T cell receptor Vβ molecules induces a high level and prolonged expansion of superantigen-reactive $CD4^+$ T cells. J Biol Chem, 2010, 285(40): 30427-30435.

[25] Fraser J D, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev, 2008, 225(1): 226-243.

[26] Malchiodi E L, Eisenstein E, Fields B A, et al. Superantigen binding to a T cell receptor beta chain of known three-dimensional structure. J Exp Med, 1995, 182(6): 1833-1845.

[27] Leder L, Llera A, Lavoie P M, et al. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor β chain and major histocompatibility complex class II. J Exp Med, 1998, 187(6): 823-833.

[28] Khandekar S S, Brauer P P, Naylor J W, et al. Affinity and kinetics of the interactions between an αβ T-cell receptor and its superantigen and class II-MHC/peptide ligands. Mol Immunol, 1997, 34(6): 493-503.

[29] Günther S, Varma A K, Moza B, et al. A novel loop domain in superantigens extends their T cell receptor recognition site. J Mol Biol, 2007, 371(1): 210-221.

[30] Ming-Kai X, Cheng-Gang Z. Gene expression and function study of fusion immunotoxin anti-Her-2-scFv-SEC2 in Escherichia coli. Appl Microbiol Biot, 2006, 70(1): 78-84.